

26 FEV. 2003

Rec'd PCT/PTO 30 JUN 2004



REC'D 24 MAR 2003

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

**10/500563****CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 10 FEV. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

**BEST AVAILABLE COPY**



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

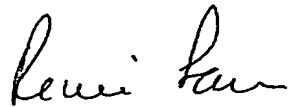
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>11 JAN 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0200294</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>11 JAN. 2002</b>		<b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>CABINET SAUVAGE</b> <b>65, boulevard Soult</b> <b>75012 PARIS</b>	
Vos références pour ce dossier (facultatif) <b>B 3304</b>			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2</b> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/>			
Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/>			
Demande divisionnaire <input type="checkbox"/>			
Demande de brevet initiale N°		Date / /	
ou demande de certificat d'utilité initiale N°		Date / /	
Transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/>			
Demande de brevet initiale N°		Date / /	
<b>3</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé d'obtention d'un système d'étalonnage unique appliqué aux dosages multiparamétriques d'échantillons biologiques, réactif immunologique préparé à cette fin et procédé de dosage			
<b>4</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation N° Date / / Pays ou organisation N° Date / / Pays ou organisation N° Date / / <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5</b> DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		BIOMEDICAL DIAGNOSTICS SA	
Prénoms			
Forme juridique		SA directoire & C. surveillance	
N° SIREN		3.3.9.6.8.5.6.1.2	
Code APE-NAF		5.1.4. N	
Adresse	Rue	Boulevard de Beaubourg	
	Code postal et ville	77183	CROISSY BEAUBOURG
Pays		France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

RENISE DES PIÈCES  
DATE 75 INPI PARIS  
LIEU 0200294  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 260399

<b>Vos références pour ce dossier :</b> (facultatif)		B 3304	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom		SAUVAGE	
Prénom		Renée	
Cabinet ou Société		CABINET SAUVAGE	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	65 boulevard Soult	
	Code postal et ville	75012	PARIS
N° de téléphone (facultatif)		01 43 07 56 12	
N° de télécopie (facultatif)		01 43 07 76 20	
Adresse électronique (facultatif)		cs@cabinet-sauvage.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHET 	
Renée SAUVAGE - CPI 92-1223			

La présente invention concerne, d'une manière générale, le domaine des dosages d'analytes à partir d'échantillons biologiques et, plus particulièrement l'étalonnage de tels procédés de dosage. De manière  
5 spécifique, la présente invention a pour objet un nouveau procédé d'obtention d'un système d'étalonnage unique, permettant de quantifier simultanément plusieurs analytes, quel que soit leur nombre et dans un même milieu réactionnel.

10 Par système d'étalonnage "unique", on entend un seul système quel que soit le nombre d'analytes recherchés simultanément.

La quantification des analytes compris dans un échantillon biologique étant devenue indispensable tant au  
15 niveau de la recherche que de la médecine classique, celle-ci a fait l'objet de nombreux développements visant non seulement à améliorer la fiabilité et la reproductibilité des dosages, mais également à en diminuer les coûts.

20 Les techniques classiques consistent à doser chaque analyte séparément et, pour ce faire, à réaliser pour chacun desdits analytes un étalonnage propre du système utilisé. Il en résulte un grand nombre de manipulations et une consommation importante en réactifs, ce qui a pour  
25 conséquence un prix relativement élevé.

Si une telle manière d'opérer reste envisageable dans le contexte de la recherche où la quantité de paramètres à doser est limitée et ciblée, elle pose un sérieux problème de coût dans le contexte de la médecine, où, en  
30 laboratoires d'analyse, l'on cherche à doser rapidement un grand nombre d'analytes.

Il a récemment été décrit, notamment dans les demandes de brevet internationales WO 99/36564 et WO 97/14028, une technique permettant de quantifier, de façon précise et  
35 reproductible, plusieurs analytes en un seul et même dosage à partir du même échantillon. Cette technique repose sur l'utilisation de différentes catégories de particules

fluorescentes, chaque catégorie de particules étant sensibilisée par des ligands ayant des propriétés différentes, lesdits ligands étant adaptés à se lier de façon directe ou indirecte aux analytes et consistant  
5 généralement en des anticorps ou des antigènes. La quantification de la réaction entre ligand et analytes est réalisée par l'intermédiaire d'un composé fluorescent de longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes de celles des particules fluorescentes.

---

10 Ainsi, une simple lecture par ~~cytométrie en flux~~ permet de quantifier la réaction associée à chaque catégorie de particules et donc de déduire de ladite quantification les quantités des différents analytes présents dans un même échantillon.

15 Cependant, cette quantification nécessite au préalable la construction d'autant de systèmes d'étalonnage que d'analytes à doser, c'est-à-dire de réaliser  $X \times Y$  dosages réservés à l'étalonnage, X étant le nombre d'analytes à doser simultanément (ou le nombre de particules  
20 sensibilisées par des ligands ayant des propriétés différentes) et Y le nombre de points d'étalonnage. Cette méthode entraîne donc non seulement un surcoût de la manipulation, mais également un problème de gestion pratique, du fait de l'encombrement des puits des  
25 micro-plaques de titration, (les tests étant généralement réalisés sur des plaques de micro-titration ELISA de 96 puits), ainsi qu'une augmentation de la durée de la manipulation.

Par exemple, pour le dosage simultané de 10 analytes,  
30 ce système implique la constitution de 10 systèmes d'étalonnage différents, soit pour 100 échantillons testés, une consommation supplémentaire en réactifs allant de 10 à 40% selon le nombre de points d'étalonnage, et un problème évident d'encombrement.

35 La présente invention vise à remédier aux inconvénients de l'art antérieur en proposant un nouveau procédé d'étalonnage unique, rapide, simple et

reproductible permettant de diminuer la consommation de réactifs consacrée à l'étalonnage, tout en diminuant également l'encombrement des plaques de titration.

5 Ce but est atteint en ce sens que la présente invention concerne un procédé d'étalonnage, ne nécessitant qu'un seul système d'étalonnage, permettant de quantifier simultanément plusieurs analytes dans un même échantillon biologique, procédé qui repose sur la préparation et l'utilisation d'un réactif immunologique spécifique.

10 Plus particulièrement, un premier aspect de la présente invention concerne un procédé de préparation d'un réactif immunologique entrant dans la composition d'un système d'étalonnage appliqué au dosage d'analytes multiples dans un même échantillon biologique, ledit  
15 procédé mettant en oeuvre différentes catégories de particules, chaque catégorie de particules étant sensibilisée par association avec un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, ledit procédé comprenant les étapes qui consistent à :

20 a) déterminer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées et pour chacune de n quantités données de ligand associées auxdites particules, la courbe de réponse en fonction de la concentration en composé homologue sur une gamme de concentrations correspondant à la plage de  
25 mesure connue de l'analyte à doser;

b) sélectionner, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, la courbe correspondant à la plus petite quantité de ligand qui donne un signal de réponse significatif et qui est compatible avec l'utilisation d'une  
30 dilution d'échantillon et d'un réactif de marquage communs à tous les analytes simultanément dosés ;

c) évaluer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, d'après la courbe retenue à l'étape b), le signal moyen correspondant au signal associé à un point  
35 caractéristique de chacune desdites courbes, obtenant ainsi autant de signaux moyens que de catégories de particules ;

d) ajuster, le cas échéant, les quantités de ligand associé à chaque catégorie de particules de sorte que l'ensemble des signaux moyens évalués à l'étape c) soit compris dans un rapport de 1 à 5, et

5 e) mélanger, dans un solvant approprié, les différentes catégories de particules sensibilisées qui répondent au critère de l'étape d).

Le procédé objet de la présente invention s'applique donc à des procédés de dosage mettant en oeuvre différentes

10 catégories de particules sensibilisées. Plus particulièrement, de tels procédés consistent principalement en des immunodosages du type :

- dosage direct, par une méthode immunométrique ou "sandwich", par exemple, d'un anticorps ayant réagi avec  
15 l'antigène spécifique fixé préalablement sur les particules,

- dosage direct, par une méthode immunométrique ou "sandwich", par exemple, d'un antigène ayant réagi avec l'anticorps spécifique fixé préalablement sur les  
20 particules, ou

- dosage indirect, par une méthode dite "par compétition", d'un antigène entrant en compétition avec un antigène similaire marqué, pour sa réaction avec l'anticorps préalablement fixé sur les particules, ou vice-  
25 versa.

Ces différents dosages seront décrits plus en détail par la suite.

La réaction développée par mise en contact des différentes catégories de particules, sensibilisées chacune  
30 par un ligand, avec les analytes à doser est mesurée par cytométrie en flux selon différents modes d'identification des particules.

On peut citer, par exemple, des particules de couleurs différentes et de taille uniforme (identifiées  
35 selon leur couleur spécifique, avec quantification des réactions analyte-ligand par adjonction d'un composé externe de longueurs d'excitation et d'émission différentes

de celles des particules), des particules de tailles différentes et de couleur identique (identifiées selon leur taille, avec quantification des réactions analyte-ligand par mesure de la taille des agrégats résultants) ou encore  
5 des particules de tailles différentes et de couleur identique (classées selon leur taille, avec quantification des réactions analyte-ligand par adjonction d'un composé externe de longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes de celles des particules). En pratique, l'un ou  
10 l'autre de ces procédés est sélectionné en fonction du nombre, plus ou moins important, de paramètres à tester.

Ces particules sont constituées généralement de polystyrène. Toutefois, elles peuvent être également constituées de tout polymère leur conférant des propriétés  
15 physico-chimiques spécifiques (fonctionnalité, densité ou encore solubilité) comme du styrène-acide maléique, du styrène-acide méthacrylique, du styrène-acrylamide ou du poly(méthacrylate de méthyle).

Par "ligand", il faut comprendre un antigène, un anticorps, mono- ou polyclonal, ou toute molécule capable  
20 de se fixer aux particules et qui est susceptible d'interagir, de quelque manière que ce soit, directement ou indirectement, avec l'analyte à doser.

On entend par "antigène" toute substance à partir de laquelle peut être générée la production d'anticorps. Parmi  
25 ces substances, on peut citer les protéines, les haptènes, les allergènes, les peptides, les médicaments ou encore les drogues.

Par "composé homologue", il faut comprendre un anticorps, un antigène ou toute molécule capable de se  
30 fixer à un ligand donné et dont le site d'interaction avec ledit ligand est similaire au site d'interaction entre l'analyte à doser et ledit ligand. Le composé homologue peut être l'analyte lui-même.

35 La première étape du procédé consiste donc à déterminer pour chaque catégorie de particules sensibilisées, telles que décrites plus haut, la



corrélation qui existe, pour une quantité donnée de ligand fixée aux particules, entre la quantité de composé homologue et la grandeur du signal émis, représentatif des interactions ligand/analyte.

5 En pratique, pour chaque catégorie de particules, plusieurs essais sont effectués en fixant une quantité donnée, différente pour chaque essai, d'un même ligand auxdites particules, en mettant ensuite en contact les particules ainsi sensibilisées avec différentes quantités  
10 de composé homologue, identiques pour l'ensemble des essais, et en mesurant le signal résultant de leur interaction.

Plus particulièrement, les quantités de ligand utilisées varient par pas de 2 à 4.

15 Les différentes quantités de composé homologue sont sélectionnées de manière à être comprises dans la plage de mesure de l'analyte que l'on cherche à doser. Ainsi, si l'on cherche à doser un analyte dont la concentration peut varier entre 0 et 100 unités biologiques, on choisira, par  
20 exemple, six quantités données de composé homologue correspondant à 0, 20, 40, 60, 80 et 100 unités biologiques. Dans la pratique, on utilise une population d'échantillons caractérisés et certifiés sur des critères clinico-biologiques, c'est-à-dire dont la présence ou  
25 l'absence en un analyte donné est validée par un diagnostic clinique et/ou par l'estimation de l'analyte par une ou plusieurs autre(s) méthode(s) de dosage.

Le résultat de cette opération se traduit par l'obtention d'une courbe dose/réponse entre la quantité de  
30 composé homologue et les signaux obtenus pour chacune des n quantités données de ligand.

Le concept d'expression de la concentration en unités biologiques repose sur l'affectation, par exemple, d'une  
35 gamme 0-150 à la plage de mesure de chacun des analytes à doser. On comprend que ces plages de mesure diffèrent, dans l'absolu, d'un analyte à l'autre et que, par suite, une même concentration en différents analytes exprimée en

unités biologiques, par exemple 95 unités biologiques (en abrégé 95 UB) ne correspond pas à la même concentration, dans l'absolu, en ces mêmes analytes. La concentration en composés homologues est exprimée, de même façon, en unités biologiques sur une gamme identique pour tous les analytes.

A ce niveau, il faut noter que la sensibilisation des particules peut être effectuée de différentes manières, à savoir par covalence, par le biais d'une couche moléculaire intermédiaire biologiquement et/ou chimiquement réactive, ou encore par l'utilisation d'un système d'interaction par affinité.

Les particules sensibilisées, dans la mesure où elles comportent une fonctionnalité réactive, peuvent être sensibilisées par covalence. Ainsi, de nombreux protocoles d'immobilisation ont été décrits comme faisant intervenir de façon non limitative les groupements fonctionnels suivants entre les particules et le ligand :

- $\text{COOH/R-NH}_2$  ou  $\text{R-OH}$ ,
- $\text{CO-NH}_2/\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ,
- $\text{C(=O)-O-CH}_3/\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ,
- $\text{NH}_2\text{CHO/RCOOH}$ , ou encore
- $\text{R-NH}_2$  ou  $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ .

Il est à noter que, lors de l'utilisation de la plupart des couples cités plus haut, il est nécessaire d'activer préalablement certaines fonctions, comme par exemple les fonctions  $\text{COOH}$ , afin qu'elles puissent réagir, par exemple, avec les groupements fonctionnels du ligand, tels que des groupements amines aliphatiques ou aromatiques.

Selon une autre forme d'exécution préférée, l'activation peut être réalisée par des carbodiimides hydrosolubles, et être effectuée en une seule étape ou, selon une forme d'exécution particulièrement préférée, en deux étapes, avec le carbodiimide seul ou en présence de

N-hydroxysuccinimide. Elle est suivie de l'élimination de l'excès d'activateur avant fixation du ligand.

Selon encore une autre forme d'exécution, un bras espaceur homo- ou hétéro-bifonctionnel, présentant des  
5 fonctions chimiques réactives à chaque extrémité, respectivement identiques ou différentes, peut être fixé aux particules préalablement activées. Ces bras de longueur et de fonctionnalité variables peuvent être activés et couplés par covalence, dans un premier temps, aux  
10 particules par l'une des extrémités, et dans un deuxième temps, au composé à fixer, par l'autre extrémité.

Des intermédiaires chimiquement ou biologiquement actifs peuvent également être utilisés pour la sensibilisation. Ils créent à la surface des  
15 microparticules une couche moléculaire intermédiaire constituée par une protéine (telle que l'albumine), un mélange de protéines ou un polymère (tel que la polylysine). Ce procédé est particulièrement utilisé dans le cas de particules de petite taille qui peuvent ensuite  
20 être couplées par l'intermédiaire d'agents de liaison sur les fonctions de cette couche intermédiaire.

Une autre voie de sensibilisation, cette fois non covalente, consiste à utiliser, de façon non limitative, des systèmes d'interaction par affinité :

- 25 - le système biotine-avidine, en utilisant des particules couplées à l'avidine qui sont mises en présence de composés ayant été préalablement biotinylés,
- 30 - la protéine A ou la protéine G, disposant d'un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines, permettant l'immobilisation d'un anticorps et l'orientation vers l'extérieur de ses fragments Fab, responsables de la reconnaissance antigénique, ou encore
- 35 - l'immobilisation indirecte par l'intermédiaire d'un anticorps spécifique du composé à fixer.

Cette énumération n'est aucunement limitative et il est évident que tout procédé de sensibilisation similaire connu de l'homme du métier peut également être utilisé.

5 Pour chaque ligand à fixer, la sélection d'un des systèmes précités est réalisée initialement pendant la phase initiale de mise au point. Les conditions opératoires sont ensuite fixées et appliquées ultérieurement de façon systématique.

10 Dans une forme d'exécution préférée, le milieu de sensibilisation est constitué d'eau tamponnée ayant un pH compris entre 5 et 9 et une force ionique comprise entre 0,01 et 0,1. Afin de maintenir constant le milieu, le ligand peut être mis en suspension dans le même milieu avant d'effectuer ladite sensibilisation.

15 L'intérêt d'un tel système réside dans sa simplicité d'utilisation, son faible coût et son indépendance réactionnelle par rapport aux autres réactions simultanées. Cela est rendu possible par le fait que la réaction produite par chaque catégorie de particules sensibilisées  
20 est standardisée et reproductible, que le signal fourni par cette réaction est représentatif de l'ensemble des réactions ligand-analyte se développant simultanément et que l'ensemble de ces réactions est maîtrisé au niveau du procédé de sensibilisation de chaque catégorie de  
25 particules de façon à ce qu'elles produisent toutes un signal similaire en présence d'échantillons de même degré de positivité, c'est-à-dire comprenant sensiblement la même quantité en l'analyte dosé telle qu'exprimée sur sa gamme d'unités biologiques particulière.

30 Une fois les courbes dose/réponse obtenues, il est déterminé, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, comme décrit à l'étape b), la courbe correspondant à la plus petite quantité de ligand donnant, graphiquement, un signal de lecture significatif et  
35 compatible avec l'utilisation d'une dilution d'échantillon ainsi que d'un réactif de marquage communs pour l'ensemble des analytes simultanément détectés.

Par "signal de réponse significatif", il faut comprendre un signal suffisamment élevé pour assurer une précision de lecture sur l'ensemble de la plage de mesure.

En pratique, la courbe sélectionnée doit être  
5 sensiblement linéaire et avoir une amplitude de mesure suffisamment élevée.

Chaque type de particule est donc sensibilisé par l'une des techniques décrites plus haut en employant la quantité de ligand déterminée ci-dessus.

10 L'étape suivante c) consiste alors à déterminer le signal moyen (SM) associé à une concentration en unités biologiques, identique pour tous les analytes.

Pour ce faire, un point caractéristique de la courbe dose/réponse retenue à l'étape b) est sélectionné et le  
15 signal correspondant graphiquement audit point est pris comme signal moyen SM.

Le point caractéristique, autrement appelé point positif ou de forte positivité, est choisi arbitrairement dans le quart supérieur de la partie linéaire de la courbe.

20 Les signaux moyens SM obtenus pour les différentes catégories de particules sensibilisées sont ensuite comparés entre eux et, si nécessaire, réajustés de sorte qu'ils soient tous compris dans un rapport de 1 à 5. En pratique, pour les catégories de particules ayant un SM non  
25 compris dans ledit rapport, la réactivité est alors réajustée en sélectionnant dans la courbe dose/réponse une autre quantité de ligand et en recommençant l'opération de sensibilisation desdites particules par cette nouvelle quantité de ligand jusqu'à obtenir que le SM résultant  
30 entre dans le rapport de 1 à 5 précité.

Le fait que les SM des différentes particules sensibilisées constituant le réactif immunologique soient tous compris dans un rapport de 1 à 5 est déterminant pour assurer une réactivité immunologique relativement  
35 équivalente pour chaque type de particules sensibilisées utilisées et donc d'obtenir, dans une gamme de mesures compatible avec la réalité biologique, des valeurs

suffisamment proches pour permettre l'utilisation d'un système d'étalonnage unique et commun à l'ensemble des analytes.

5 Le réactif immunologique est alors constitué par mélange, dans un solvant, des différents types de particules sensibilisées ainsi obtenues.

10 On peut citer comme solvants possibles : des mélanges de protéines et d'acides aminés ou encore un mélange de protéines inertes vis-à-vis des analytes à doser et permettant une stabilisation de particules.

15 En tout état de cause, les solvants utilisés sont sélectionnés de manière à permettre la conservation de l'ensemble des particules sensibilisées, et leur choix se trouve donc dicté par la nature des ligands les plus contraignants.

De ce fait, ledit solvant peut être défini de sorte qu'il est adapté et commun à l'ensemble des ligands.

20 Afin de rendre industrialisable un tel procédé de préparation du réactif immunologique, faisant intervenir la réactivité individuelle de différentes particules couplées à des ligands spécifiques, les conditions expérimentales de sensibilisation, à savoir le pH, la force ionique, le volume, la température ou encore la durée du couplage, sont préalablement fixés et standardisés pour l'ensemble des  
25 particules. Seule varie ensuite, comme décrit plus haut, la quantité de ligand à ajuster.

En pratique, le solvant utilisé est tamponné à un pH compris entre 7 et 9 et a une force ionique comprise entre 0,01 et 0,1.

30 Selon un second aspect de la présente invention, celle-ci porte sur un réactif immunologique destiné au dosage d'analytes multiples dans des échantillons biologiques, ledit réactif comprenant un solvant et, mélangées au sein dudit solvant, différentes catégories de  
35 particules, dont chacune est sensibilisée par association avec une quantité donnée en un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, avec, pour chacune des catégories de

particules, et pour une concentration donnée en composé  
homologue du ligand, telle qu'exprimée en unités  
biologiques, ladite quantité donnée de ligand débouchant  
sur un signal dit "signal moyen", qui est compris dans un  
5 rapport de 1 à 5 avec les signaux moyens obtenus pour les  
autres catégories de particules.

Selon un troisième aspect, la présente invention  
concerne un kit de dosage d'analytes multiples dans des  
échantillons biologiques mettant en oeuvre différentes  
10 catégories de particules, ~~chaque catégorie de particules~~  
étant sensibilisée par un ligand spécifique de l'un des  
analytes à doser, qui comprend :

- i) un réactif immunologique issu du procédé selon  
l'une quelconque des revendications 1 à 6,
- 15 ii) au moins un standard d'étalonnage constitué d'un  
unique composé homologue réagissant avec l'une des  
catégories de particules entrant dans la composition du  
réactif immunologique,
- iii) une table de correspondance entre la  
20 concentration, exprimée en unités biologiques, du composé  
homologue constituant le standard d'étalonnage et celle de  
chacun des composés homologues aux autres ligands fixés sur  
les autres catégories de particules entrant dans la  
composition du réactif immunologique, et
- 25 iv) un réactif de marquage.

Plus particulièrement, ledit standard d'étalonnage  
comprend un composé homologue réagissant directement ou  
indirectement avec le ligand fixé à la particule  
sensibilisée.

30 La fixation indirecte peut se faire, par exemple, par  
l'intermédiaire d'une protéine utilisée pour saturer les  
sites de fixation de la particule non occupés par le  
ligand. Cette protéine doit être choisie de façon à ne pas  
interférer avec le système spécifique et être présente sur  
35 une seule catégorie de particule. Dans ce cas, le milieu de  
quantification devra contenir un réactif de marquage  
spécifique des analytes à doser (constitué d'un ou de

particules, et pour une concentration donnée en composé  
homologue du ligand, telle qu'exprimée en unités  
biologiques, ladite quantité donnée de ligand débouchant  
sur un signal dit "signal moyen", qui est compris dans un  
5 rapport de 1 à 5 avec les signaux moyens obtenus pour les  
autres catégories de particules.

Selon un troisième aspect, la présente invention  
concerne un kit de dosage d'analytes multiples dans des  
échantillons biologiques mettant en oeuvre différentes  
10 catégories de particules, chaque catégorie de particules  
étant sensibilisée par un ligand spécifique de l'un des  
analytes à doser, qui comprend :

i) un réactif immunologique issu du procédé tel que  
décrit plus haut,

15 ii) au moins un standard d'étalonnage constitué d'un  
unique composé homologue réagissant avec l'une des  
catégories de particules entrant dans la composition du  
réactif immunologique,

20 iii) une table de correspondance entre la  
concentration, exprimée en unités biologiques, du composé  
homologue constituant le standard d'étalonnage et celle de  
chacun des composés homologues aux autres ligands fixés sur  
les autres catégories de particules entrant dans la  
composition du réactif immunologique, et

25 iv) un réactif de marquage.

Plus particulièrement, ledit standard d'étalonnage  
comprend un composé homologue réagissant directement ou  
indirectement avec le ligand fixé à la particule  
sensibilisée.

30 La fixation indirecte peut se faire, par exemple, par  
l'intermédiaire d'une protéine utilisée pour saturer les  
sites de fixation de la particule non occupés par le  
ligand. Cette protéine doit être choisie de façon à ne pas  
interférer avec le système spécifique et être présente sur  
35 une seule catégorie de particule. Dans ce cas, le milieu de  
quantification devra contenir un réactif de marquage  
spécifique des analytes à doser (constitué d'un ou de



plusieurs composés) et un réactif de marquage spécifique de la protéine inerte.

Dans une première forme d'exécution, ledit composé homologue est de même origine que l'analyte à doser, par exemple, d'origine humaine.

Dans une seconde forme d'exécution, ledit composé homologue et l'analyte à doser sont d'origines différentes.

Alors que, par exemple, l'analyte à doser est d'origine humaine, tel que des autoanticorps présents dans des échantillons sanguins humains, le composé homologue peut être, par exemple, d'origine animale pour autant qu'il soit capable de réagir spécifiquement avec le ligand. Le milieu de quantification devra, dans ce cas, contenir, à la fois un réactif de marquage spécifique des échantillons d'origine humaine et un réactif de marquage spécifique du standard d'origine animale.

La préparation du standard d'étalonnage implique une optimisation préalable de sa concentration de façon à produire un SM compris dans un rapport de 1 à 5 par rapport aux SM obtenus pour chaque catégorie de particules sensibilisées lors de la préparation du réactif immunologique.

Pour ce qui est de la "table de correspondance", celle-ci consiste en un référentiel, pouvant se présenter sous la forme d'un tableau, d'un graphique, etc., qui donne les différentes concentrations, exprimées en unités biologiques, du composé homologue constituant le standard d'étalonnage et celle de chacun des composés homologues aux autres ligands fixés sur les autres catégories de particules entrant dans la composition du réactif immunologique.

La table de correspondance est réalisée empiriquement, préalablement à la préparation des kits, de la manière suivante.

On fait réagir plusieurs échantillons, comprenant des quantités différentes et connues d'analytes à doser avec le réactif immunologique qui fera partie du kit. On mesure les

signaux résultants et l'on trace, pour chaque analyte, la droite de régression linéaire liant les signaux émis aux quantités connues, exprimées en unités biologiques, des analytes dosés, selon une équation de type  $y=ax$ , avec  
5  $y=\text{signal}$  et  $x=\text{concentration}$  en unités biologiques.

On mesure, de même, le signal obtenu lors de la réaction entre le standard d'étalonnage et le réactif immunologique et l'on relève, sur chaque courbe précédemment obtenue, la concentration, exprimée en unités  
10 biologiques, correspondant à cette même valeur de signal.

C'est l'ensemble de ces concentrations en analytes, exprimées en unités biologiques, qui constitue la table de correspondance.

La concentration du standard peut être ensuite  
15 vérifiée à partir de la table de correspondance et ajustée si nécessaire.

Dans une variante, il peut être souhaité de réaliser une gamme d'étalonnage, c'est-à-dire de partir de plusieurs standards d'étalonnage constitué chacun du même composé  
20 homologue, mais selon différentes concentrations.

Dans ce cas, le principe de réalisation de la table de correspondance reste le même, mis à part que l'on trace pour chaque analyte, à partir des différents signaux obtenus, la droite de régression liant les signaux émis aux  
25 quantités connues, en unités biologiques, des analytes à doser selon une équation de type  $\log y=a(\log x)$ , avec  $y=\text{signal}$  et  $x=\text{concentration}$  en unités biologiques.

Cette équation est ensuite appliquée aux signaux correspondant aux différentes concentrations connues de standard d'étalonnage de façon à déduire la correspondance  
30 entre chacune desdites concentrations et la concentration de chaque analyte, exprimée en unités biologiques.

Pour ce qui est du "réactif de marquage", celui-ci consiste en un composé immunologique susceptible de  
35 quantifier la réaction entre les analytes et le réactif immunologique, ledit composé immunologique étant couplé à un marqueur qui est, de préférence un fluorochrome.

Par "composé immunologique", il faut comprendre tout composé, naturel ou de synthèse, susceptible de se complexer spécifiquement avec un composé complémentaire, tels que les anticorps et les antigènes.

5        Selon une forme d'exécution préférée, ledit réactif de marquage réagit avec le complexe composé homologue ou analyte à doser / ligand, auquel cas le dosage est direct, ou avec le ligand non complexé, auquel cas le dosage est indirect.

10        ~~En outre, le réactif de marquage peut être préparé à~~  
partir d'un composé unique, réagissant avec, par exemple, une spécificité antigénique commune à l'ensemble des composés homologues, ou résulter du mélange de différents composés réagissant spécifiquement avec différents composés  
15 homologues.

      Selon un dernier aspect de la présente invention, celle-ci porte sur un procédé de dosage d'analytes présents dans un échantillon biologique et, plus particulièrement, un procédé de mise en oeuvre du kit tel que décrit plus  
20 haut qui consiste à mesurer les signaux résultants de l'interaction entre le réactif immunologique et, d'une part, l'échantillon biologique, d'autre part, le standard d'étalonnage, et à déterminer et appliquer, aux différents signaux résultants, un facteur de correction de manière à  
25 obtenir la titration, exprimée en unités biologiques, de chaque analyte de l'échantillon, ledit facteur de correction étant le rapport entre le signal obtenu pour le standard d'étalonnage et les concentrations issues de la table de correspondance.

30        Le procédé de mise en oeuvre du kit selon la présente invention repose donc sur trois étapes, à savoir une première étape de détermination des différents signaux émis par cytométrie en flux, une seconde étape de calcul pour déterminer les différents facteurs de correction à partir  
35 du signal émis par le standard d'étalonnage et une troisième étape de calcul pour la titration de chaque analyte de l'échantillon à partir du facteur de correction

précédemment obtenu et les signaux émis par les différents échantillons testés.

Plus particulièrement, le procédé objet de la présente invention comprend les étapes suivantes :

- 5 a) incuber, d'une part, l'échantillon biologique et, d'autre part, le standard d'étalonnage, avec une quantité prédéterminée de réactif immunologique ;
- b) ajouter le réactif de marquage ;
- c) mesurer, par cytométrie en flux, les signaux émis,  
10 d'une part, par le standard d'étalonnage, d'autre part par l'échantillon ;
- d) déterminer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, un facteur de correction qui correspond au rapport entre la concentration en unités biologiques de  
15 chaque analyte à doser telle que donnée par la table de correspondance et le signal correspondant au standard d'étalonnage et mesuré à l'étape c) ;
- e) multiplier par ledit facteur de correction, calculé pour chaque analyte, le signal émis par chaque  
20 catégorie de particules et mesuré à l'étape c) pour en déduire la concentration en unités biologiques de chaque analyte dans l'échantillon testé.

Dans une première variante, le procédé objet de la présente invention peut être appliqué à des dosages  
25 directs. Dans de tels dosages, le réactif de marquage est spécifique des analytes que l'on cherche à doser et, de ce fait, la quantité d'analytes compris dans un échantillon est directement proportionnelle au signal émis par ledit réactif de marquage.

30 Une première application à la quantification simultanée et directe d'anticorps de spécificités antigéniques différentes est envisagée avec lesdits analytes à doser qui consistent en des anticorps, lesdits ligands en des antigènes et ledit réactif de marquage est  
35 constitué par un ou plusieurs seconds anticorps marqués par un fluorochrome réagissant spécifiquement avec les anticorps que l'on cherche à doser.

Dans ce cas, le réactif immunologique est constitué de différentes catégories de particules sensibilisées chacune par un antigène spécifique. Les anticorps que l'on cherche à doser vont se complexer avec le ou lesdits antigène(s) fixé(s) aux particules. Le réactif de marquage, qui est constitué par un ou plusieurs second(s) anticorps marqué(s) par un fluorochrome et spécifique(s) des anticorps que l'on cherche à doser, va se fixer auxdits anticorps préalablement complexés avec les antigènes formant la couche de sensibilisation des particules. Ainsi, le signal émis par le fluorochrome associé à chaque catégorie de particules est proportionnel à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.

Par "seconds anticorps", il faut comprendre toute substance capable de se complexer avec les anticorps que l'on cherche à doser, c'est-à-dire capable de réagir avec un épitope desdits anticorps différent de celui mis en oeuvre pour assurer leur fixation au ligand.

Une seconde application à la quantification simultanée et directe de différents antigènes est envisagée avec lesdits analytes à doser qui consistent en des antigènes, lesdits ligands en des anticorps et ledit réactif de marquage en un mélange de seconds anticorps marqués par un fluorochrome réagissant spécifiquement avec les antigènes que l'on cherche à doser.

Le principe est ici identique à celui décrit plus haut.

Dans une seconde variante, le procédé objet de la présente invention peut être appliqué à des dosages dits indirects. De tels dosages sont non plus basés uniquement sur la complémentarité entre deux espèces immunologiques, mais sur la compétition entre deux espèces immunologiques proches à se complexer avec une troisième espèce immunologique.

Ainsi, selon une première possibilité, il est envisagé la quantification simultanée et indirecte de différents antigènes avec lesdits analytes à doser qui

consistent en des antigènes, lesdits ligands en des anticorps et ledit réactif de marquage en un mélange d'antigènes marqués par un fluorochrome entrant en compétition avec les analytes à doser pour se complexer avec les ligands.

Dans ce cas, le réactif immunologique est constitué de différentes catégories de particules sensibilisées chacune par un anticorps spécifique. Les antigènes que l'on cherche à doser vont alors entrer en compétition avec le ou lesdits antigènes, marqués par un fluorochrome, constituant le réactif de marquage. Ainsi, l'augmentation de la concentration en antigène que l'on cherche à doser entraîne l'augmentation de la concentration en complexes antigène que l'on cherche à doser / anticorps fixé, au détriment de la formation de complexes antigène marqué / anticorps fixé, avec corrélativement une diminution du signal. Il en résulte que le signal émis par le fluorochrome associé à chaque catégorie de particules est inversement proportionnel à la quantité d'antigènes présente dans l'échantillon.

Une seconde application à la quantification simultanée et indirecte de différents anticorps est envisagée avec lesdits analytes à doser qui consistent en des anticorps, lesdits ligands en des antigènes et ledit réactif de marquage en un mélange d'anticorps marqués par un fluorochrome entrant en compétition avec les analytes à doser pour se complexer avec les ligands.

La présente invention sera mieux comprise à la lecture des exemples suivants.

#### MATERIEL ET METHODE

Le système de particules sensibilisées utilisées dans les exemples ci-après appartient au système Luminex®.

Les particules utilisées sont de taille uniforme (5,5  $\mu$ m) et se distinguent les unes des autres par une coloration spécifique (100 couleurs, du rouge à l'orange).

Le système de détection de ces particules est un cytomètre en flux interfacé avec un système informatique pour le traitement du signal émis par différents lasers : un premier laser, en classant chaque catégorie de particules sur la base de son intensité de fluorescence unique, permet d'identifier quel composé est analysé. Parallèlement, un laser vert excite un composé fluorescent externe utilisé pour quantifier la réaction spécifiquement associée à chaque catégorie de particules colorées.

10 Selon d'autres formes d'exécution, et d'après les connaissances de l'homme du métier, il peut également être utilisé des lasers autres qu'un laser vert.

15 Exemple 1 : Dosage simultané des anticorps anti-nucléaires (ANA) dirigés contre les antigènes suivants : SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl70, Jo1, dsDNA, centromère.

a) Préparation du réactif immunologique.

20 Huit catégories de particules de polystyrène colorées et fonctionnalisées par des groupements COOH sont sélectionnées. Préalablement à la sensibilisation, les particules sont activées par un procédé qui consiste en :

- la séparation des huit catégories de particules dans huit tubes différents,
- 25 - l'ajout de 1 ml d'une solution de carbodiimide dosé entre 10 et 40 mg/ml, fraîchement préparée, à 1 ml de chaque type de particules (soit environ  $10^7$  particules),
- l'incubation pendant 20 à 60 minutes à température ambiante, et
- 30 - trois lavages des particules à l'eau distillée en centrifugeant à 10000xg pendant 2 minutes pour éliminer l'excès de carbodiimide.

Parallèlement, les quantités en chaque ligand, ou antigène, devant être fixées aux différentes catégories de particules ont été déterminées suivant l'invention, comme décrit plus haut.

Les particules ainsi activées sont ensuite sensibilisées par des antigènes différents, selon la catégorie de particules, par suspension de chaque solution de particules activées dans un volume de 1 ml contenant de 50 à 500  $\mu\text{g}$  d'antigènes différents.

On obtient ainsi le système suivant :

Catégorie de Particules	Nature de l'antigène (ligand)
1	SSA
2	SSB
3	Sm
4	Sm/NRP
5	Scl70
6	Jo1
7	dsDNA
8	centromère

Les étapes suivantes consistent en :

- l'incubation pendant 4 à 6 heures à température ambiante,

- le lavage des particules à l'eau distillée,

- la mise en suspension dans un tampon pH 8 contenant un mélange de substances aminées afin de saturer les sites libres et ramener les particules à une concentration de l'ordre de  $10^6$  à  $5 \cdot 10^6$  particules par ml.

Le réactif immunologique est alors constitué d'un mélange d'un aliquote de 500  $\mu\text{l}$  de chaque catégorie de particules colorées et sensibilisées, et il est conservé à +4°C jusqu'à son utilisation.

Les figures 1 et 2 donnent, à titre d'exemple, trois courbes dose/réponse obtenues pour deux types de ligands (respectivement SSA et SSB) exprimant le signal de fluorescence émis (axe des Y) en fonction de la concentration en composé homologue en unités biologiques (axe des X). Ces courbes permettent de sélectionner la plus



petite quantité de ligand correspondant à un signal de réponse significatif, ceci sur une plage de mesure de 0 à 150 unités biologiques environ.

Pour chaque système, cinq échantillons ont été sélectionnés en fonction de leur titre en unités biologiques, déterminé par ELISA (coffret ENA-LISA, commercialisé par la déposante). La concentration en composé homologue, la prise d'essai et la dilution sont communes.

10 Pour ce qui est du système SSA (~~Figure 1~~), les trois courbes représentées A, B et C correspondent respectivement à des concentrations en antigènes SSA de 300, 150 et 75 µg/ml de particules. La courbe retenue pour le système SSA est la courbe B, correspondant à une concentration de 150 µg d'antigène SSA par ml de particules. La concentration supérieure de 300 µg (courbe A) se traduit par une saturation de la réaction antigène-anticorps pour les valeurs élevées. La concentration inférieure de 75 µg (courbe C) ne permet pas d'obtenir une réponse d'amplitude suffisante, d'où une imprécision potentielle des résultats.

20 Pour ce qui est du système SSB, les trois courbes représentées A', B' et C' correspondent respectivement à des concentrations en antigènes SSB de 100, 50 et 25 µg/ml de particules. La courbe retenue pour le système SSB est la courbe B', correspondant à 50 µg d'antigène SSB par ml de particules. La concentration supérieure de 100 µg (courbe A') se traduisant par une courbe quasi-identique n'est pas retenue. La concentration inférieure de 25 µg (courbe C') ne permet pas d'obtenir une réponse d'amplitude suffisante, notamment dans les faibles valeurs.

#### b) Etalonnage.

Un seul standard d'étalonnage est réalisé. Dans cet exemple, on choisit la catégorie de particules 1 fixées à l'antigène SSA. Le standard d'étalonnage, c'est-à-dire le composé homologue, est ici une solution, diluée en tampon

phosphate pH 7,4, d'anticorps humains purifiés et dirigés contre l'antigène SSA.

La table de correspondance, pour ce standard d'étalonnage est la suivante :

5

SSA	SSB	Sm	Sm/NRP	Sc170	Jo1	dsDNA	Centro.
90 UB	60 UB	180 UB	150 UB	145 UB	120 UB	90 UB	60 UB

Cette table a été obtenue comme indiqué plus haut.

c) Mesure du signal émis par le standard d'étalonnage  
 10 Pour les particules 1, sensibilisées à l'antigène SSA, réagissant avec le standard d'étalonnage, on obtient par cytométrie en flux un signal moyen (SM), testé au moins en double, correspondant à 80, par exemple.

15 d) Détermination des facteurs de correction.

Afin de déterminer les facteurs de correction à attribuer à chaque spécificité, on divise les concentrations ci-dessus, exprimées en unités biologiques dans la table de correspondance, par la valeur du signal mesuré pour le standard d'étalonnage, c'est-à-dire la  
 20 valeur obtenue avec les particules 1 sensibilisées avec l'antigène SSA (80).

On obtient les facteurs de correction suivants :

SSA	SSB	Sm	Sm/NRP	Sc170	Jo1	dsDNA	Centro.
1,12	0,75	2,25	1,87	1,81	1,5	1,12	0,75

25

Ces facteurs de correction seront utilisés lors du dosage d'analytes dans des échantillons biologiques. Ainsi, si l'on dose, au moyen du réactif immunologique ayant précédemment donné un signal de 80 avec le standard  
 30 d'étalonnage, l'analyte SSB dans un échantillon, et que l'on obtient un signal correspondant à 120, on pourra déterminer le titre de l'analyte SSB en multipliant la

valeur de ce signal par le facteur de correction associé à l'analyte SSB (ici 0,75). Le titre de SSB dans l'échantillon sera donc, dans cet exemple, égal à  $0,75 \times 120 = 90$  UB.

5

Exemple 2 : Dosage simultané des anticorps anti-cytoplasme de polynucléaires neutrophiles (ANCA) dirigés contre les antigènes suivants : myéloperoxydase (MPO) et protéinase 3 (PR3).

10

a) Préparation du réactif immunologique.

Dans cet exemple, seules deux particules colorées différentes sont sensibilisées séparément avec les deux  
15 antigènes MPO et PR3, de façon identique à l'exemple 1.

Le réactif immunologique est ensuite constitué par un mélange d'un aliquote de 500  $\mu$ l de chaque catégorie de particules colorées. Il est conservé à +4°C jusqu'à utilisation.

20

b) Etalonnage.

Pour l'étalonnage, selon le principe même de l'invention, on utilise un seul standard d'étalonnage. Dans cet exemple, on choisit la catégorie de particules fixées à  
25 l'antigène MPO. Le standard d'étalonnage, c'est-à-dire le composé homologue, est ici une solution, diluée en tampon phosphate pH 7.4, d'anticorps humains purifiés et dirigés contre l'antigène MPO. Le protocole est le même que celui utilisé dans l'exemple 1.

30 La table de correspondance, pour ce standard d'étalonnage, est la suivante :

MPO	PR3
140 UB	250 UB

c) Mesure du signal émis par le standard d'étalonnage

Le même protocole que dans l'exemple 1 est utilisé pour déterminer ledit signal. Le signal moyen (SM) obtenu pour le standard d'étalonnage (testé en double) réagissant avec les particules MPO correspond, par exemple, à 150.

d) Détermination des facteurs de correction

Afin de déterminer les facteurs de correction à attribuer à chaque spécificité, on divise les concentrations ci-dessus, exprimées en unités biologiques, par la valeur du signal du standard d'étalonnage, c'est-à-dire les particules 1 sensibilisées à l'antigène MPO (S=150).

On obtient les facteurs de correction suivants :

MPO	PR3
0.93	1.66

De manière similaire à l'exemple 1, si l'on dose, au moyen du réactif immunologique ayant précédemment donné un signal de 150 avec le standard d'étalonnage, l'analyte PR3 dans un échantillon, et que l'on obtient un signal correspondant à 110, on pourra déterminer le titre de l'analyte PR3 en multipliant la valeur de ce signal par le facteur de correction associé à l'analyte PR3 (ici 1,66). Le titre de PR3 dans l'échantillon sera donc, dans cet exemple, égal à  $1,66 \times 110 = 183$  UB.

Exemple 3 : évaluation des réactifs préparés dans les exemples 1 et 2 et comparaison avec des méthodes de références.

Afin d'évaluer les réactifs immunologiques préparés dans les exemples 1 et 2 et comparer leurs résultats avec ceux des méthodes de référence de type ELISA, la

spécificité et la sensibilité desdits réactifs ont été étudiées.

a) Détermination de la spécificité.

- 5 La spécificité a été évaluée à partir de 50 échantillons sériques issus de donneurs de sang et de 34 échantillons sélectionnés pour leurs interférences biologiques potentielles (hypergammaglobulinémie, gammopathies monoclonales, autres autoanticorps, 10 échantillons plasmatiques...). Ces échantillons constituent le groupe 1.

b) Détermination de la sensibilité.

- La sensibilité a été évaluée à partir d'échantillons 15 sériques, sélectionnés pour chaque dosage multiparamétrique, caractérisés cliniquement et issus de l'analyse de routine d'un laboratoire d'immunologie (Hôpital Tenon, Paris, France). Ces échantillons 20 constituent le groupe 2, soit respectivement 57 et 35 échantillons pour la détection des ANA et des ANCA.

c) Protocole d'évaluation de la spécificité et de la sensibilité des échantillons :

- Ce protocole consiste à prélever 50  $\mu$ l de réactif 25 immunologique préparé dans l'exemple 1 et à le mélanger, d'une part, à 100  $\mu$ l de standard d'étalonnage (déposé en double) et, d'autre part, à 100  $\mu$ l d'échantillons prédilués au 1/200 dans un tampon phosphate (type PBS, pH 7,4). Les dépôts et mélanges se font dans une microplaque de 96 puits 30 disposant à leur base d'une membrane filtrante de 1,2  $\mu$ m. Un puits est réservé au mélange du réactif immunologique avec le tampon, seul, afin de constituer le « blanc réactif », permettant d'évaluer le signal associé à chaque catégorie de particules qui sera ensuite soustrait 35 systématiquement du signal obtenu pour les autres puits.

Les étapes suivantes consistent à :

- incuber pendant 30 minutes à température ambiante,

- laver deux fois avec filtration à travers la membrane filtrante de la microplaque,

- remettre le milieu en suspension dans 100  $\mu$ l de réactif de marquage, constitué par un anticorps de chèvre réagissant spécifiquement avec les immunoglobulines G humaines et conjugué à la phycoérythrine. Sa concentration est adaptée à l'ensemble des systèmes "ligand-composé homologue" à détecter simultanément,

- incuber pendant 30 minutes, et

- analyser par cytométrie en flux.

Ce faisant, au moins 200 particules de chaque catégorie sont analysées pendant 15 à 25 secondes selon le nombre de catégories présentes simultanément. Pendant ce temps, le système informatique classe chacune des particules selon sa couleur et détermine ensuite la fluorescence moyenne émise par le conjugué pour chaque spécificité d'anticorps.

d) Méthodes comparatives utilisées.

Les résultats obtenus avec les réactifs préparés dans les exemples 1 et 2 ont été comparés avec ceux issus de la mise en oeuvre de trousse de dosage du commerce (Biomedical Diagnostics, Marne-La-Vallée, France) : coffrets ELISA (DNA-LISA, ENA-LISA, MPO-LISA et PR3-LISA) et substrat Hep2000 pour la détermination par immunofluorescence indirecte du centromère.

## RESULTATS

30

Evaluation de la spécificité (échantillons du groupe 1).

détection des ANA : tous les échantillons du groupe 1 ont été trouvés négatifs par le test multiparamétrique utilisant les réactifs préparés dans l'exemple 1 et par le protocole utilisant un coffret ELISA.

détection des ANCA : tous les échantillons du groupe 1 ont été trouvés négatifs par le test multiparamétrique utilisant les réactifs préparés dans l'exemple 2 ; un seul  
5 résultat était discordant en utilisant un coffret ELISA : il s'agissait d'un faux positif pour la détermination de la spécificité antigénique PR3 développé par un échantillon issu d'un patient présentant une hypergammaglobulinémie IgG.

10

Evaluation de la sensibilité (échantillons du groupe 2)

15 détection des ANA : elle a été effectuée sur 57 échantillons cliniquement caractérisés pour la détection des ANA et issus du groupe 2. Une concordance de 98,7% a été obtenue sur 399 tests réalisés simultanément avec le  
20 test multiparamétrique utilisant les réactifs préparés dans l'exemple 1 et avec un coffret ELISA. La figure 3 annexée présente les résultats comparatifs obtenus, exprimés en unités biologiques (UB), pour le test multiparamétrique (axe des Y) par rapport au test ELISA individuel (axe des X). Les coefficients de corrélation sont compris entre 0,92  
25 et 0,97 pour les spécificités ANA. Pour le centromère, une concordance totale a été obtenue avec l'immunofluorescence indirecte (10 échantillons positifs et 47 échantillons négatifs). La méthode d'immunofluorescence indirecte consiste en une méthode semi-quantitative utilisant comme  
30 substrat des cellules humaines tumorales Hep-2 transfectées. La révélation des autoanticorps fixés au substrat se fait grâce à un conjugué anti-immunoglobulines humaines marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine. La présence d'anticorps anti-centromère se traduit par une  
35 fluorescence mouchetée sur le noyau à l'interphase. La lecture s'effectue au microscope à fluorescence, en

déterminant la dernière dilution de l'échantillon où cette fluorescence reste visible.

détection des ANCA : elle a été effectuée sur 35  
5 échantillons cliniquement caractérisés pour la détection  
des ANCA et issus du groupe 2. Une concordance de 97,1% a  
été obtenue sur 70 tests réalisés simultanément avec le  
test multiparamétrique utilisant les réactifs préparés dans  
l'exemple 2 et avec un coffret ELISA. La figure 4 annexée  
10 présente les résultats comparatifs obtenus, exprimés en  
unités biologiques (UB), pour le test multiparamétrique  
(axe des Y) par rapport au test ELISA individuel (axe des  
X). Les coefficients de corrélation sont compris entre 0,87  
et 0,85 pour les spécificités ANCA. Ces coefficients plus  
15 faibles que ceux de la détection des ANA sont dus à la  
forte amplification des valeurs positives dans le cas du  
dosage multiparamétrique.



# REVENDECATIONS

1. Procédé de préparation d'un réactif immunologique entrant dans la composition d'un système d'étalonnage appliqué au dosage d'analytes multiples dans un même échantillon biologique, ledit procédé mettant en oeuvre différentes catégories de particules, chaque catégorie de particules étant sensibilisée par association avec un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, caractérisé

10 en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à :

a) déterminer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées et pour chacune de n quantités données de ligand associées auxdites particules, la courbe de réponse en fonction de la concentration en composé homologue sur une gamme de concentrations correspondant à la plage de mesure connue de l'analyte à doser;

b) sélectionner, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, la courbe correspondant à la plus petite quantité de ligand qui donne un signal de réponse significatif et qui est compatible avec l'utilisation d'une dilution d'échantillon et d'un réactif de marquage communs à tous les analytes simultanément dosés ;

c) évaluer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, d'après la courbe retenue à l'étape b), le signal moyen correspondant au signal associé à un point caractéristique de chacune desdites courbes, obtenant ainsi autant de signaux moyens que de catégories de particules ;

d) ajuster, le cas échéant, les quantités de ligand associé à chaque catégorie de particules de sorte que l'ensemble des signaux moyens évalués à l'étape c) soit compris dans un rapport de 1 à 5, et

e) mélanger, dans un solvant approprié, les différentes catégories de particules sensibilisées qui répondent au critère de l'étape d).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, dans l'étape a), les quantités de ligand utilisées varient par pas de 2 à 4.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la sensibilisation desdites particules par lesdits ligands est effectuée par covalence, par le biais d'une couche moléculaire intermédiaire biologiquement et/ou chimiquement réactive, ou encore par l'utilisation d'un système d'interaction par affinité.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration en composé homologue est exprimée en unités biologiques sur une gamme qui est identique pour tous les analytes.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le solvant utilisé à l'étape e) est adapté et commun à l'ensemble des ligands.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdits ligands consistent en des antigènes et/ou des anticorps.

7. Réactif immunologique destiné au dosage d'analytes multiples dans des échantillons biologiques, ledit réactif comprenant un solvant et, mélangées au sein dudit solvant, différentes catégories de particules, dont chacune est sensibilisée par association avec une quantité donnée en un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, caractérisé en ce que, pour chacune des catégories de particules, et pour une concentration donnée en composé homologue du ligand, telle qu'exprimée en unités biologiques, ladite quantité donnée de ligand débouche sur un signal dit "signal moyen", qui est compris dans un rapport de 1 à 5 avec les signaux moyens obtenus pour les autres catégories de particules.

8. Kit de dosage d'analytes multiples dans des échantillons biologiques mettant en oeuvre différentes catégories de particules, chaque catégorie de particules étant sensibilisée par un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) un réactif immunologique issu du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6,

ii) au moins un standard d'étalonnage constitué d'un unique composé homologue réagissant avec l'une des catégories de particules entrant dans la composition du réactif immunologique,

5       iii) une table de correspondance entre la concentration, exprimée en unités biologiques, du composé homologue constituant le standard d'étalonnage et celle de chacun des composés homologues aux autres ligands fixés sur les autres catégories de particules entrant dans la  
10 ~~composition du réactif immunologique, et~~

iv) un réactif de marquage.

9. Kit selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit standard d'étalonnage comprend un composé homologue réagissant directement ou indirectement avec le  
15 ligand fixé à la particule sensibilisée.

10. Kit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit composé homologue est de même origine que l'analyte à doser.

11. Kit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en  
20 ce que ledit composé homologue et l'analyte à doser sont d'origines différentes.

12. Kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce que ledit réactif de marquage consiste en un composé immunologique susceptible de  
25 quantifier la réaction entre les analytes et le réactif immunologique, ledit composé immunologique étant couplé à un marqueur qui est, de préférence un fluorochrome.

13. Kit selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit réactif de marquage réagit avec le complexe  
30 composé homologue ou analyte à doser / ligand, auquel cas le dosage est direct, ou avec le ligand non complexé, auquel cas le dosage est indirect.

14. Procédé de mise en oeuvre du kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, caractérisé en ce  
35 qu'il consiste à mesurer les signaux résultants de l'interaction entre le réactif immunologique et, d'une part, l'échantillon biologique, d'autre part, le standard

ii) au moins un standard d'étalonnage constitué d'un unique composé homologue réagissant avec l'une des catégories de particules entrant dans la composition du réactif immunologique,

5       iii) une table de correspondance entre la concentration, exprimée en unités biologiques, du composé homologue constituant le standard d'étalonnage et celle de chacun des composés homologues aux autres ligands fixés sur les autres catégories de particules entrant dans la  
10 composition du réactif immunologique, et

iv) un réactif de marquage.

9. Kit selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit standard d'étalonnage comprend un composé homologue réagissant directement ou indirectement avec le  
15 ligand fixé à la particule sensibilisée.

10. Kit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit composé homologue est de même origine que l'analyte à doser.

11. Kit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en  
20 ce que ledit composé homologue et l'analyte à doser sont d'origines différentes.

12. Kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce que ledit réactif de marquage consiste en un composé immunologique susceptible de  
25 quantifier la réaction entre les analytes et le réactif immunologique, ledit composé immunologique étant couplé à un marqueur qui est, de préférence un fluorochrome.

13. Kit selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit réactif de marquage réagit avec le complexe  
30 composé homologue ou analyte à doser / ligand, auquel cas le dosage est direct, ou avec le ligand non complexé, auquel cas le dosage est indirect.

14. Procédé de mise en oeuvre du kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 13, caractérisé en ce  
35 qu'il consiste à mesurer les signaux résultants de l'interaction entre le réactif immunologique et, d'une part, l'échantillon biologique, d'autre part, le standard

d'étalonnage, et à déterminer et appliquer, aux différents signaux résultants, un facteur de correction de manière à obtenir la titration, exprimée en unités biologiques, de chaque analyte de l'échantillon, ledit facteur de correction étant le rapport entre le signal obtenu pour le  
5 standard d'étalonnage et les concentrations issues de la table de correspondance.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à :

10 ~~a) incuber, d'une part, l'échantillon biologique et,~~  
d'autre part, le standard d'étalonnage, avec une quantité prédéterminée de réactif immunologique ;

b) ajouter le réactif de marquage ;

c) mesurer, par cytométrie en flux, les signaux émis,  
15 d'une part, par le standard d'étalonnage, d'autre part par l'échantillon ;

d) déterminer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, un facteur de correction qui correspond au rapport entre la concentration en unités biologiques de  
20 chaque analyte à doser telle que donnée par la table de correspondance et le signal mesuré à l'étape c) pour le standard d'étalonnage ;

e) multiplier par ledit facteur de correction, calculé pour chaque analyte, le signal émis par chaque  
25 catégorie de particules et mesuré à l'étape c) pour en déduire la concentration en unités biologiques de chaque analyte dans l'échantillon testé.

16. Procédé selon la revendication 15, appliqué à la quantification simultanée et directe d'anticorps de  
30 spécificités antigéniques différentes, caractérisé en ce que lesdits analytes à doser consistent en des anticorps, lesdits ligands consistent en des antigènes et en ce que ledit réactif de marquage est constitué par un ou plusieurs seconds anticorps marqués par un fluorochrome réagissant  
35 spécifiquement avec les anticorps que l'on cherche à doser.

17. Procédé selon l'une des revendications 15 ou 16, appliqué à la quantification simultanée et directe de

différents antigènes, caractérisé en ce que lesdits analytes à doser consistent en des antigènes, lesdits ligands consistent en des anticorps et en ce que ledit réactif de marquage consiste en un mélange de seconds  
5 anticorps marqués par un fluorochrome réagissant spécifiquement avec les antigènes que l'on cherche à doser.

18. Procédé selon la revendication 15 ou 16, appliqué à la quantification simultanée et indirecte de différents antigènes, caractérisé en ce que lesdits analytes à doser  
10 consistent en des antigènes, lesdits ligands consistent en des anticorps et en ce que ledit réactif de marquage consiste en un mélange d'antigènes marqués par un fluorochrome entrant en compétition avec les analytes à doser pour se complexer avec les ligands.

15 19. Procédé selon la revendication 15 ou 16, appliqué à la quantification simultanée et indirecte de différents anticorps, caractérisé en ce que lesdits analytes à doser consistent en des anticorps, lesdits ligands consistent en des antigènes et en ce que ledit réactif de marquage  
20 consiste en un mélange d'anticorps marqués par un fluorochrome entrant en compétition avec les analytes à doser pour se complexer avec les ligands.

SSA

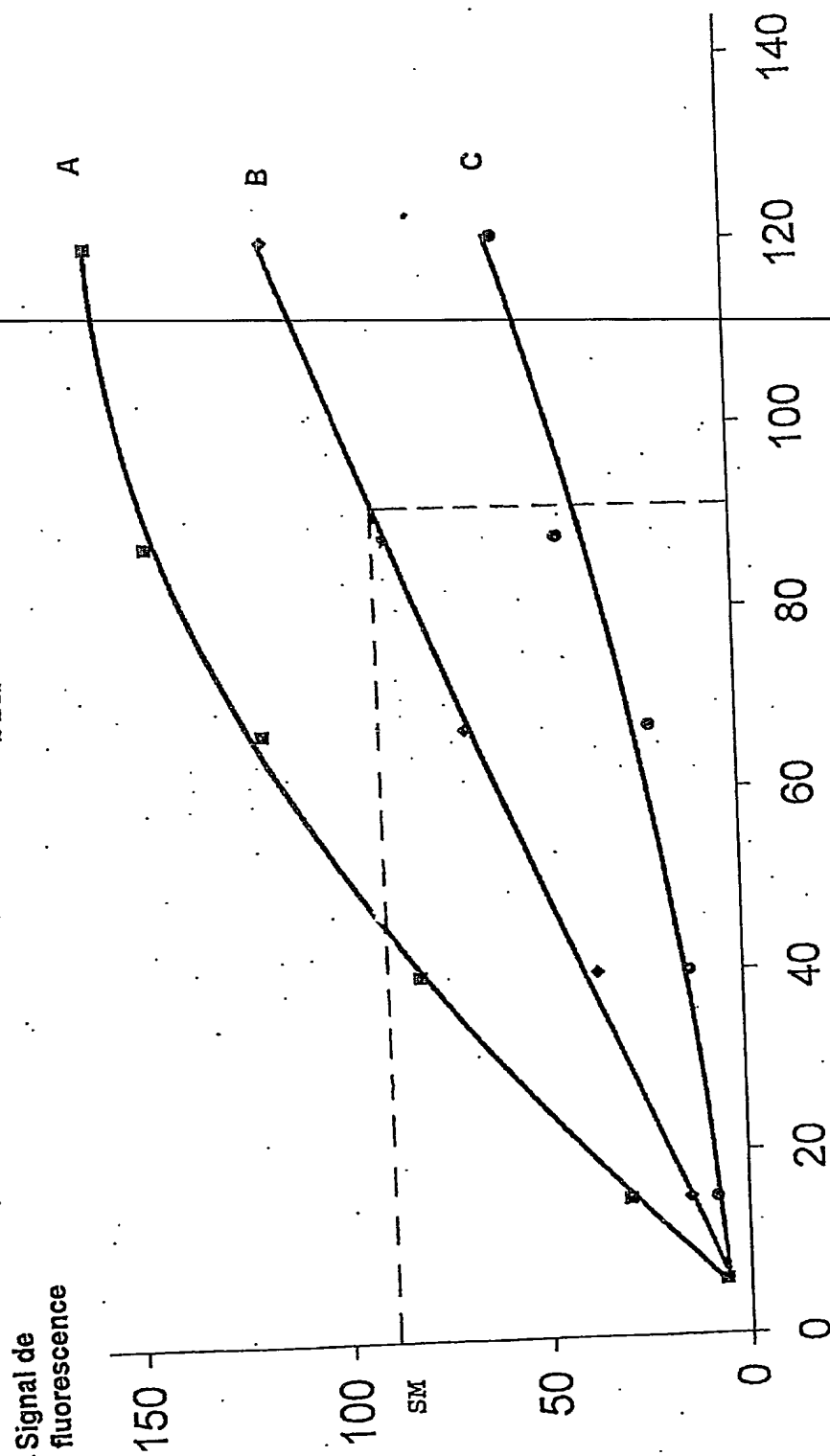
Signal de  
fluorescenceConcentration  
en composé  
homologue (UB)

FIGURE 1

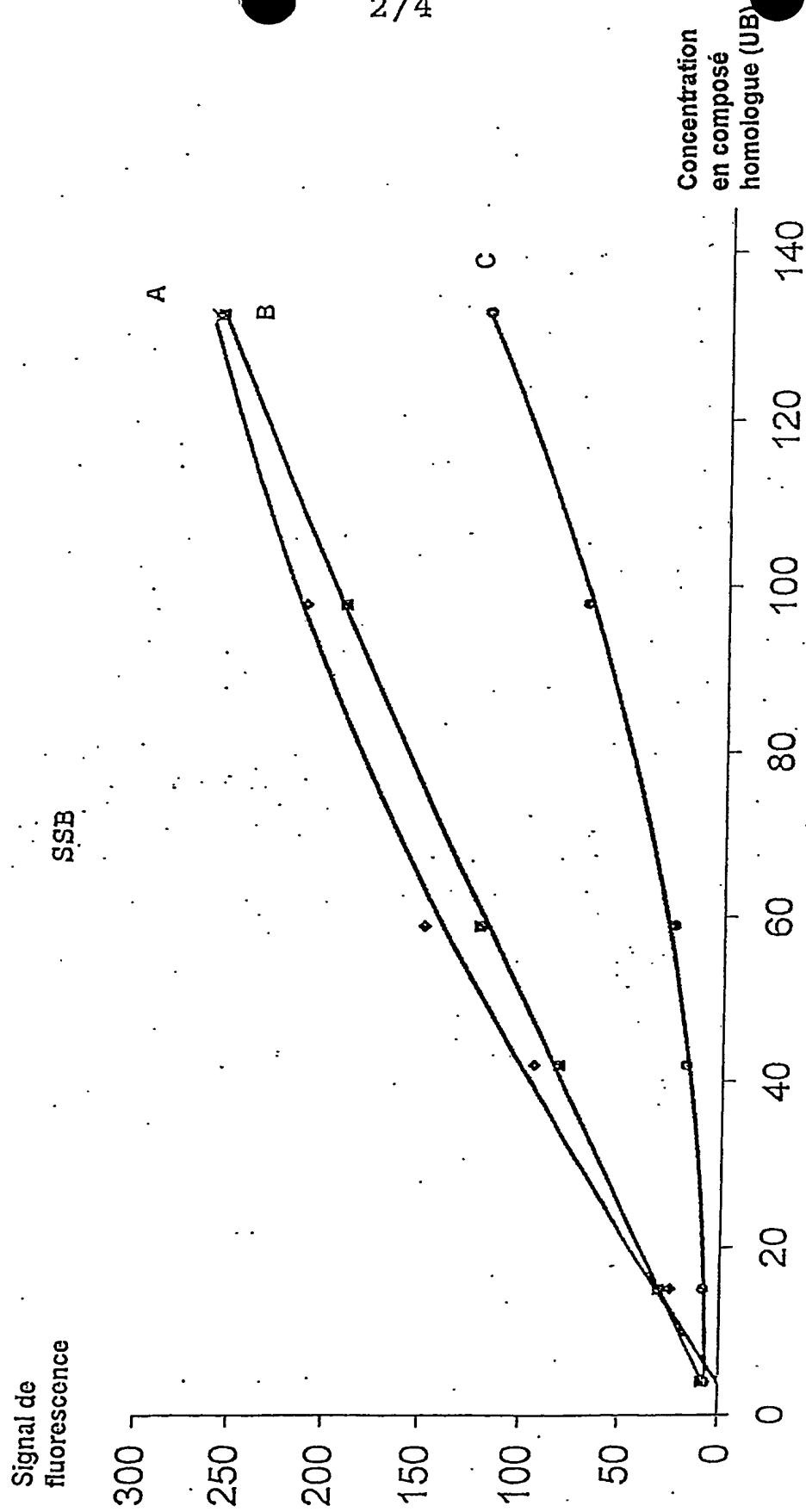


FIGURE 2



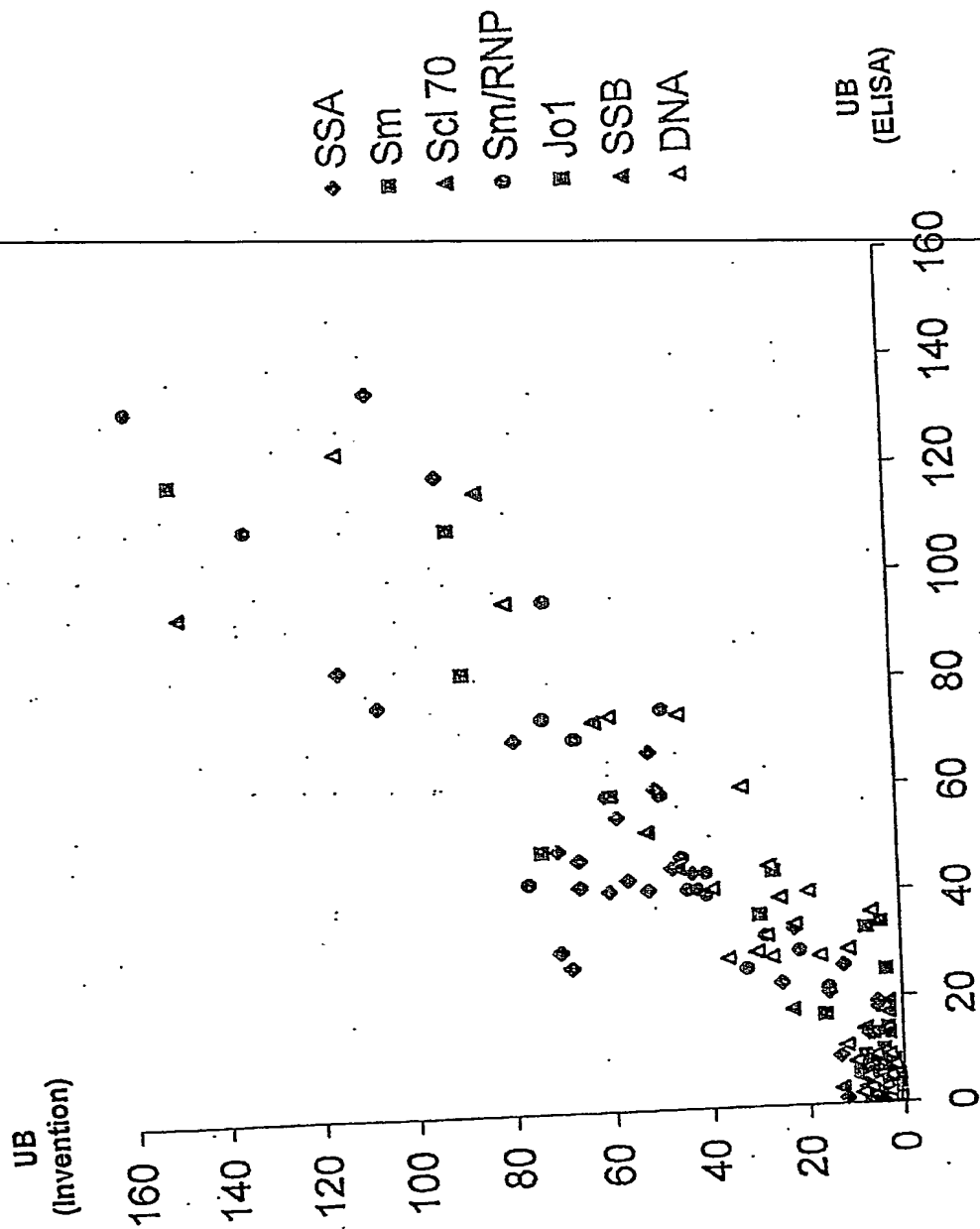


FIGURE 3

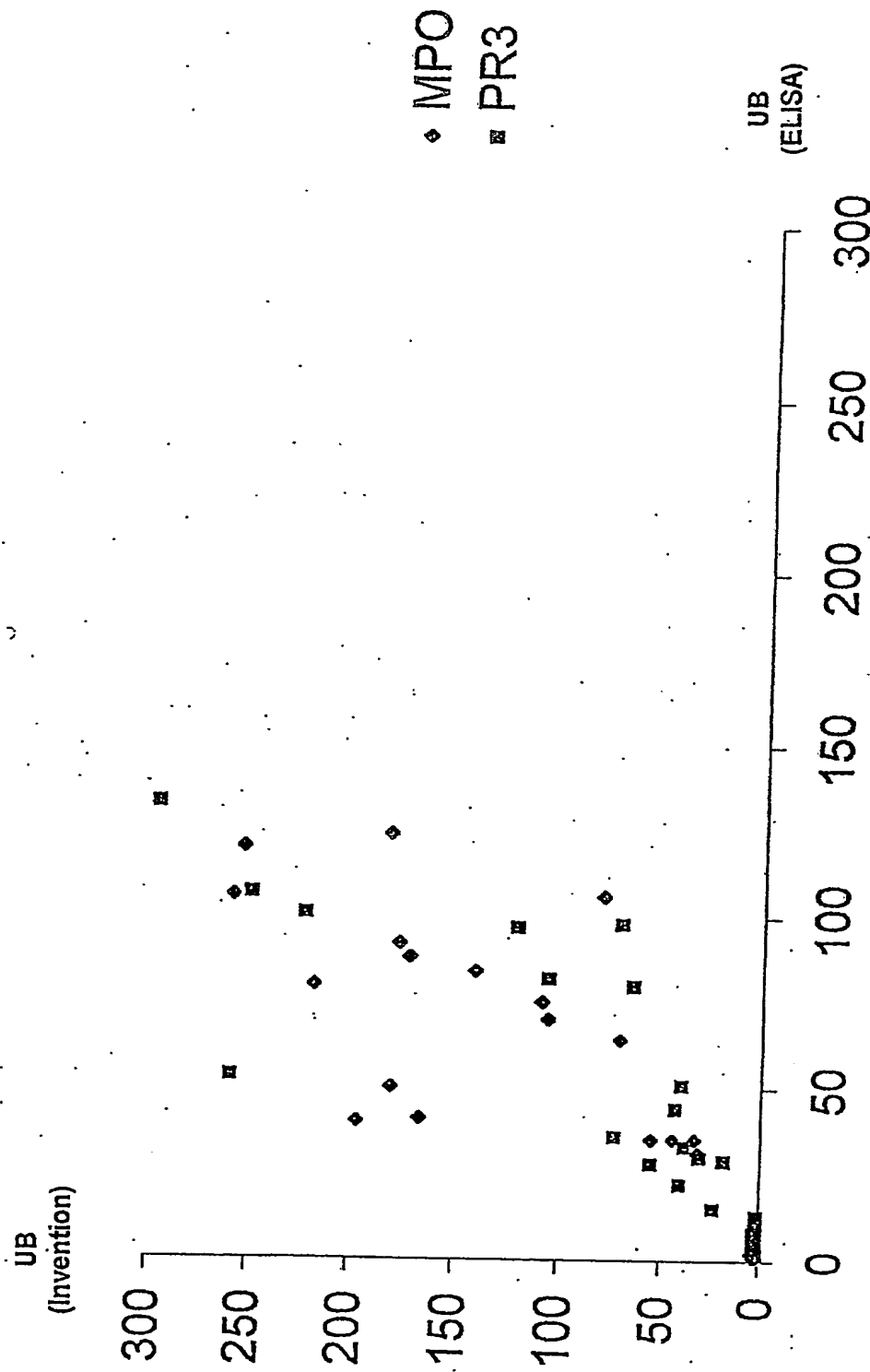


FIGURE 4

reçue le 31/01/02



**BREVET D'INVENTION**

**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235\*

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .../...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 264

Vos références pour ce dossier  
(facultatif)

B 3304

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

0200294

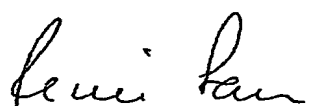
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé d'obtention d'un système d'étalonnage unique appliqué aux dosages multiparamétriques d'échantillons biologiques, réactif immunologique préparé à cette fin et procédé de dosage

LE(S) DEMANDEUR(S) :

BIOMEDICAL DIAGNOSTICS SA

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		LAROCHE	
Prénoms		Pascale	
Adresse	Rue	14 rue des Meuniers	
	Code postal et ville	75012	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 11 janvier 2002 Renée SAUVAGE (Mandataire) - CPI 92-1223 	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**